北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的克隆、表达及其启动子分析

魏灵敏，温少莹，马际凯，夏辉，李嘉昱，吴栩佳，李火根*

（南京林业大学 林木遗传与生物技术教育部重点实验室，南京林业大学 南方现代林业创新中心，南京，210037）

摘要：叶原基来源于茎顶端分生组织（shoot apical meristem, SAM）的周围区，*AGO1* 基因在叶原基分化过程中发挥着重要作用。为深入探究叶原基分化成叶器官的形态建成机制，该研究以北美鹅掌楸为材料，采用 RT-PCR 和 RACE 克隆技术获得 *LtAGO1* 的 cDNA 全长和启动子序列，并预测其功能；通过 RT-qPCR 分析 *LtAGO1* 在鹅掌楸属中的组织表达模式。同时，经抗性筛选和 DNA 鉴定获得 *ProAGO1* :: *GUS* 的转基因拟南芥株系，并进一步对 T2 代阳性植株进行表型和 GUS 组织化学染色分析。结果表明：（1） *LtAGO1* 基因包含 3 300 bp 的开放阅读框，编码 1 100 个氨基酸，分子量为 122.14 kD，理论等电点（pI）为 9. 36。（2）氨基酸序列分析表明 *LtAGO1* 含 Gly-rich-AGO1 和 Piwi 两个典型的 *AGO* 基因结构域，同源性分析表明 LtAGO1 蛋白与沉水樟 AGO1 蛋白（RWR84608.1）亲缘关系最近。（3）组织表达特异性分析发现 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸不同组织间的相对表达量为雄蕊>花芽>花瓣>花萼>叶片>雌蕊>叶芽>茎；*LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片不同发育阶段的相对表达量为叶芽萌动期>幼叶期>衰老期>成熟期；*AGO1* 在鹅掌楸属叶缘的表达量高于叶片的其他部位，且北美鹅掌楸叶凹陷部位的表达量高于叶尖部位。（4）获得叶中侧轴向和基顶轴向的极性缺失、叶缘锯齿、重瓣花型的转化株系，GUS 组织染色发现 *LtAGO1* 启动 GUS 基因在叶芽顶端稳定表达，且在新分化的叶柄上表达较强，在成熟期的茎、叶、花和果的维管束中均特异表达。*LtAGO1* 启动子的 GUS 活性强度为叶顶芽>花>维管束，这与实时定量 PCR 结果相一致。综上研究结果表明 *LtAGO1* 基因在顶端分生组织特异表达，且受到多种途径的调控而参与到叶和花器官的发育进程中。该研究为进一步了解北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的基本功能及其调控叶形发育机制提供了理论基础。

关键词：北美鹅掌楸，*AGO1*，叶极性，GUS，组织表达

中图分类号：S722.5

Cloning, characterization and functional analysis of *LtAGO1* and its promoter from *Liriodendron tulipifera*

WEI Lingmin , WEN Shaoying , MA Jikai , XIA Hui , LI Jiayu , WU Xujia , LI Huogen*

（*Key Laboratory of Forest Genetic & Biotechnology of Ministry of Education*, *Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China*, *Nanjing Forestry University*, Nanjing, 210037）

Abstract：*AGO1* plays an important role in the differentiation of leaf primordia, originating from the the peripheral region of Shoot Apical Meristem(SAM). To study the morphogenesis mechanism of leaf primordium differentiation, we cloned 2 001bp upstream region of *LtAGO1* CDS as the promoter by RT-PCR and RACE technology on the basis of previous cloned *LtAGO1* gene sequence, and predicted its function. Real-time PCR was used to investigate expression pattern in *Liriodendron* L. We obtained the transgenic *Arabidopsis thaliana* of ProAGO1::GUS by resistance screening and DNA dentification, and then monitored phenotype and GUS histochemical staining. The results were as follows: (1) The *LtAGO1* gene included an open reading frame for 3300 bp , encoded 1 100 amino acid , the molecular weight was 122.14 kD and theoretical isoelectric point was

收稿日期：2021-02-20

基金项目：国家自然科学基金项目（31770718）[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31770718)]。

作者简介：魏灵敏（1991-），博士研究生，主要从事森林遗传学研究，（E-mail）lmwei2019@njfu.edu.cn。

***通信作者**：李火根，教授，博士研究生导师，主要从事森林遗传学研究，（E-mail）hgli@njfu.edu.cn。

9.36. (2)Amino acid sequence analysis showed that it consisted of Gly-rich-AGO1 and Piwi conserved domains of AGO family. Phylogenetic trees revealed that LtAGO1 was closed to *Cinnamomum micranthum* （RWR84608.1） in evolutional relationship. (3)The specific tissues expression analysis demonstrated that the expression order was that stamen>floral bud>petal>calyx>leaf>pistil>leaf bud>stem among tissues, and the expression order was that leaf bud sprouting stage >young leaf stage>senescence stage >mature stage among stages. It was highly expressed in the leaf margin of *Liriodendron* L, and *LtAGO1* gene expression in leaf tooth sinus was higher than in leaf tooth tip of *Liriodendron tulipifera.* (4)The transgenic strains leaf polarity of the middle and basal apical axis was absent with serrated leaf margin and double petal flower. It was found that GUS staining was stably detected at the tip of leaf bud of transgenic seedlings , the higher GUS activity was observed at newly differentiated petioles. *LtAGO1* promoter drove GUS gene to accumulate specifically in the vascular bundle of *Arabidopsis thaliana* leaf , flower, pod and stem, and GUS activity intensity order was that leaf tip bud> flower>vascular bundle among tissues, which was accordance with the Real-time PCR results in *Liriodendron tulipifera*. Therefore, the results also showed that *LtAGO1* gene was predominantly expressed in apical meristem and regulated by various pathways during the development of leaf and flower. It will provide a foundation for further functional research of AGO1 protein and regulation mechanism of leaf shape development.
Key words: *Liriodendron tulipifera*, *AGO1*, Leaf polarity, GUS, tissue expression

叶是高等植物进行光合作用和蒸腾作用的主要器官，叶原基起源于茎顶端分生组织（shoot apical meristem, SAM）的周边区。在控制细胞由分裂转入生长的形态建成过程中，叶原基发生了极性分化(Bowman & Eshed, 2000)。前人的研究已证明，*AGO1* 基因的突变将会影响叶原基分化及器官极性的选择等一系列发育进程(Wu et al.，2009； Liu & Nonomura, 2016)。王永益(2019)通过点突变能获得拟南芥针状叶的 *ago1-27* 突变体和卷曲芽状复叶的 *ago1-38* 突变体。李素芬等(2014)对 *AtAGO1* 超表达得到了叶缘呈锯齿状的拟南芥。在模式植物水稻和玉米中，采用敲除、过表达 *AGO1* 基因及互补缺陷突变体的方法，初步明确 *AGO1* 基因的缺失会降低水稻的结实率和花粉育性，而 *AGO1* 基因的过表达能使叶片正面卷曲、株高降低 (Li et al.，2019；徐东东， 2014)。番茄 *SlmiR168* 靶向调控 *SlAGO1a* 基因的表达，增强了番茄对低钾胁迫的抗性（Liu et al.，2020）；拟南芥 *ago1-27* 比野生型对淹水更敏感，且在低氧条件下和 *AGO4* 共同调控该胁迫信号的的传递(Elena et al.，2020)。姚晓华等(2021)发现，青稞 *HvtAGO1* 编码的蛋白在抗条纹病的调控通路中发挥重要作用。目前的研究发现，*AGO1* 是通过诱导茉莉酸（JA）信号通路基因的产生并激活 JA 反应来响应胁迫（Liu et al.，2018）。可见，*AGO1* 是通过多种途径参与到植物抗逆的响应调节中。此外，有研究发现 *AGO1d* 参与小麦花药和花粉粒的发育（冯楠，2018），拟南芥根分生组织需要 *AGO1* 的活性来维持细胞的增殖（Adrien et al.，2019）。*AGO1* 基因在植物器官极性选择、分生组织分化、花器官发育和胁迫响应等多方面起重要调控作用。

北美鹅掌楸与鹅掌楸都是以叶形奇特、干型优美为特色的具有观赏价值的园林树种。它们的叶片具有三裂和五裂的形态差异，是研究观叶树种叶形多样性及品种改良的理想材料。近年来，杨颖等（2014）证实北美鹅掌楸中有 9 个 *LtNAC* 基因参与叶片的衰老进程。Ma et al.（2018，2019）探明了鹅掌楸从叶原基分化成叶片 4 个阶段的形态发育过程，从转录组中筛选验证了 10 条与叶发育相关的差异基因，并发现 *LcKNOX6* 基因可使拟南芥叶序紊乱、叶片深裂及不育。然而，目前对于北美鹅掌楸奇特叶形的形成机制仍不清楚，*AGO1* 基因是否参与了叶形发育的调控进程，与北美鹅掌楸叶芽和花芽孕育的关系也尚未明确，这些均有待于研究。

高等植物的生长发育过程受基因的表达量控制，基因的转录水平受包含顺式作用元件的启动子影响(Dey et al.，2015)。有研究发现拟南芥 *AtADR* 和 *AtAIF* 启动子可调控花和花药的发育 (Dai et al.，2019；Shih et al.，2014)，表明启动子在影响植物的性状和调控方式上也发挥着重要作用。本研究采用 RACE 克隆技术获得北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因的全长 cDNA，并对其进行生物信息学预测及组织差异表达分析，初步了解了该基因功能，并重点关注 *LtAGO1* 基因启动子序列的分析和组织表达特异性，旨在为 *LtAGO1* 基因启

动子对相关基因的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 不同组织的取样

为明确该基因在鹅掌楸属叶片不同部位间的表达差异，在南京林业大学下蜀实习林场鹅掌楸种源试验林中，选取物候期基本一致的北美鹅掌楸（美国南卡罗莱纳州种源）和鹅掌楸（中国武夷山种源）为供试材料，于 2018 年 4 月分别采集长势良好的三个株系幼嫩叶片的三个部位（叶缘、叶基部和叶中部），具体方法参考沈宗根等（2003）。为了解该基因在北美鹅掌楸中的组织表达模式，于 4 月采集北美鹅掌楸同一时期的 8 个组织样品（叶片、茎、雄蕊、雌蕊、花芽、花萼、叶芽和花瓣）。为探明叶发育过程中该基因的时间表达差异，于 2018 年 3—8 月间，分别采集北美鹅掌楸叶芽萌动期、幼叶期、叶成熟期、叶衰老期的叶片，具体方法参考肖怀娟（2014）。为进一步明确叶缘形态的发生部位，现将其划分为 7 个部分：a、c 和 e 为叶缘凸出部分，b 和 d 为叶缘凹陷部分，f 为叶柄，g 为叶中间部分。据前期的物候观察发现，在 7 月北美鹅掌楸叶片的形态变异最大。因此，于 2018 年 7 月采集北美鹅掌楸不同大小的叶片，用消毒的剪刀分离样品至 1 g，具体方法参考李四游（2015）。所有样品重复取样 3 次，置于-80 ℃超低温冰箱中保存，用于提取 RNA。

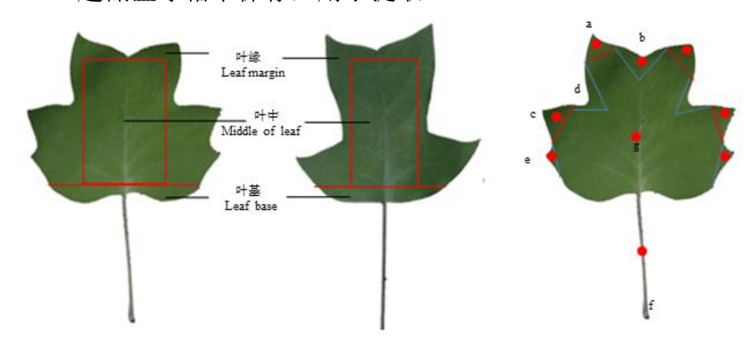


图 1 北美鹅掌楸和鹅掌楸叶片及采样部位

Fig.1 Schematic diagram of sampling in *Liriodendron chinense* and *Liriodendron tulipifera*

1.1.2 生化试剂

植物总 RNA 提取试剂盒购自天根（TIANGEN）生物公司，PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time) 反转录试剂盒、3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒、SMARTer®RACE 5'/3' Kit 反转录试剂盒、PrimeSTAR®Max DNA Polymerase 高保真酶、DL 2 000 DNA marker 和 SYBR Premix Ex Taq 酶均购自 Takara 公司，核酸染料 GelStain、EasyPure Quick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒和 Blunt 载体均购自北京全式金生物技术有限公司，ClonExpress®Ultra One Step Cloning Kit 重组酶购自诺唯赞生物公司，大肠杆菌（*Escherichia coli*）T1 与农杆菌（*Agrobacterium*）GV3101 购自上海唯地生物公司，过表达载体 PBI121-GUS 由本实验室提供，引物合成由南京金斯瑞公司完成，其编号及序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆

根据北美鹅掌楸(*L. tulipifera*)转录组数据库（http://ancangio.uga.edu/content/liriodendron-tulipifera），筛选出注释名为 *AGO1* 基因的 EST 序列，通过 Oligo7 软件设计 PCR 扩增引物，以北美鹅掌楸叶芽的 cDNA、3 RACE cDNA 和 5 RACE cDNA 为模板，扩增 *LtAGO1* 基因的 3 个目的片段。PCR 体系为 50 μL，扩增程序：98 ℃ 3 min；98 ℃ 10 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共 35 个循环；72 ℃彻底延伸 5 min。将目的片段连接至 Blunt 载体后转化大肠杆菌 T1 感受态细胞，挑菌送测。利用 DNAMAN 软件拼接后获得全长 cDNA 序列，使用 NCBI ORF Finder 在线软件（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测开放阅读框并设计引物，验证基因克隆的正确性。依据验证成功的 *AGO1* 基因 CDS 序列，查找其上游启动子序列。该启动子序列信息来自于鹅掌楸（庐山种源）NJFU-Lchi-2.0 基因组测序结果（Chen et al.，2019），利用同源克隆法设计验证引物，引物序列见表 1。使用改良 CTAB 法（马明等，2007）提取采样组织的 DNA，以此为模板扩增出约 2 000 bp 的启动子序列并测序确认。

1.2.2 *LtAGO1* 基因的生物信息学分析

使用 NCBI conserved domain 在线软件（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd）预测 LtAGO1 蛋白的保守结构域。使用 ExPASy 中的 Protparam 工具（https://web.expasy.org/protparam/）在线分析蛋白质理化性质，使用 SOPMA 在线软件（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）和 Phyre2 在线软件（http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index）分别预测蛋白质二、三级结构，使用 Signal P 5.0 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测蛋白是否含信号肽，使用 PSORT 在线软件（https://wolfpsort.hgc.jp/）预测蛋白亚细胞的定位情况。在 NCBI 数据库 BLASTx 中查找同源序列，使用 ClustalX 软件分析 LtAGO1 蛋白同源性和 MEGA 7 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树。使用 PlantCARE 数据库（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html）对克隆得到的启动子序列进行顺式作用元件分析。

1.2.3 *LtAGO1* 基因的表达分析

使用植物总 RNA 提取试剂盒分别提取鹅掌楸属不同发育时期的叶片及不同组织的总 RNA，并反转录合成 cDNA 的第一链，稀释 20 倍后作为 RT-qPCR 模板。通过 Oligo7 软件设计荧光定量 PCR 引物，参考本实验室鹅掌楸内参基因 *Actin97*（Tu et al.，2019）进行实时定量 qPCR 反应，引物序列见表 1。反应体系为 20 μL，分别为 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ10 μL，上下游引物各 0.4 μL（5 μmol • L^{-1}），ROX Reference Dye or Dye Ⅱ0.4 μL，模板（100 ng）2 μL，RNAase-free ddH$_2$0 6.8 μL。扩增程序：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，60℃退火 34 s，40 个循环。试验进行 3 次生物学重复，用 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 法（Livak et al.，2001）计算并分析基因的相对表达量。

1.2.4 构建载体及转化、筛选

为了研究克隆获得的 *LtAGO1* 上游 2 001 bp 序列是否具有启动子活性，使用 *Xbar* I 和 *Hind* Ⅲ 酶分别酶切超表达载体 PBI121 质粒，经电泳跑胶确定目标产物后切胶， 并回收目的片段。利用诺唯赞同源重组酶将带酶切位点的 PCR 目的产物构建到酶切后的表达载体 PBI121 上，并转入大肠杆菌中扩增， 获得 GUS 表达载体 PBI121-ProAGO1-GUS。将经 PCR、酶切及测序后鉴定正确的 GUS 表达载体质粒转进农杆菌 GV3101，并通过花序浸染法（Clough & Bent, 1998）转染到野生型拟南芥中。将收种得到的 T0 代拟南芥种子播种在含有 50mg •L^{-1} 卡那霉素（Kanamycin）的 1/2MS 培养基上，筛选出具有抗卡那霉素（Kanamycin）的转基因植株，利用启动子测序引物对 T1 代拟南芥叶片的 DNA 进行 PCR 鉴定，以野生型植株为阴性对照。将符合预期结果的转基因植株继代筛选至 T2 代，用于 GUS 染色分析。

1.2.5 转基因拟南芥植株的表型观察

转基因株系和野生型拟南芥种子先后经 75%酒精、10%次氯酸钠消毒和 3 次纯水洗涤过后，同时播种在 1/2MS 培养基（pH = 5.8）中，4 ℃春化 2 d 后，置于温度 25 ℃、光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗、光照强度为 5 000 lx 的人工光照培养箱内。光照培养 10 d 后，测量拟南芥幼苗根长并记录，试验进行 5 次重复。

1.2.6 转基因拟南芥植株的 GUS 组织化学染色

参照 Solarbio 公司即用型 GUS 试剂盒说明书，分别选取在 1/2MS 培养基上生长 4、6、9、12、16、20 和 25 d 等不同时期及不同组织的转 *ProAGO1*::GUS 的 T2 代拟南芥转化株，按 Jefferson（1987）的方法放到染色液中染色，37 ℃过夜孵育，75%酒精洗涤脱色 5～6 次后在体视显微镜下拍照。以 GV3101 空菌株浸染野生型拟南芥为阴性对照，35S::GUS 空载体浸染的拟南芥为阳性对照。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5′-3′) Sequence	用途 Application
LtAGO1-F	CGTGGTGGTGGAGGATATCA	中间片段扩增
LtAGO1-R	AGCAGTGGGAGTTGTAACAG	fragment amplification
LtAGO1-3Outer	CTGCTCTCAAGGACAATGTGAA	3′ RACE
LtAGO1-3Inner	ACTCTTTGCTGGACTTCTGCTATCCTGATG	

LtAGO1-5Outer	GTGCAGCTCGGGATCAGACGGCCTATGAGA	5′ RACE
LtAGO1-5Inner	TGACACCACTGGAATGTTGA	
LtAGO1-qRT-F	AGGGCCAATTTTATCAGGTC	荧光定量
LtAGO1-qRT-R	TCAACAGAATAGCGATCCGAA	Fluorescent quantitative
LcActin97-F	TTCCCGTTCAGCAGTGGTCGTG	内参
LcActin97-R	GTCGCACAACTGGTATCG	Reference
Hind III-F	CACTCATTAGGCACCCCAGG	鉴定
GUS-R	ATCCAGACTGAATGCCCAC	Testing
LtAGO1-QC-F	ATGGTGAGAAAGAGGAGAA	开放阅读框扩增
LtAGO1-QC-R	TCAGCAGTAGAACATCACC	ORF amplification
LtAGO1-Pro-F	ATACCCAGCAGATAACGAA	启动子克隆
LtAGO1-Pro-R	GATTACTCTCGCTTAGTCA	Promoter cloning
proLtAGO1-GUS-F	GACCATGATTACGCCAAGCTT	载体构建
	ATACCCAGCAGATAACGAA	Vector construction
proLtAGO1-GUS-R	ACCACCCGGGGATCCTCTAGA	
	GATTACTCTCGCTTAGTCA	

2 结果和分析

2.1 *LtAGO1* 基因全长 cDNA 的获得

从北美鹅掌楸叶芽中获得了 *AGO1* 中间片段长度为 3 592 bp，利用 RACE 克隆获得了长度为 440 bp 和 636 bp 的 5′ 和 3′ 端序列（图 2：A），经拼接得到 4 258 bp 的 cDNA 全长序列。经 ORF finder 预测到 5′ -UTR 序列长度为 78 bp，3′ -UTR 序列长度为 880 bp，含 13 个 polyA，ORF 长度为 3 300 bp，共编码 1 100 个氨基酸。对 ORF 两端设计引物扩增并测序验证，结果显示开放阅读框序列长度大小与拼接序列一致，且无变异位点。蛋白结构分析得到该蛋白包含两个保守结构域：Gly-rich-AGO1 和 Piwi，其中 Piwi 结构域位于 AGO1 的 C 端，含有 RNA 5′ 端结合位点和对 mRNA 有切割作用的活性位点(图 2：B)。以上结果验证了所得 cDNA 序列的正确性，故将该基因命名为 *LtAGO1*。

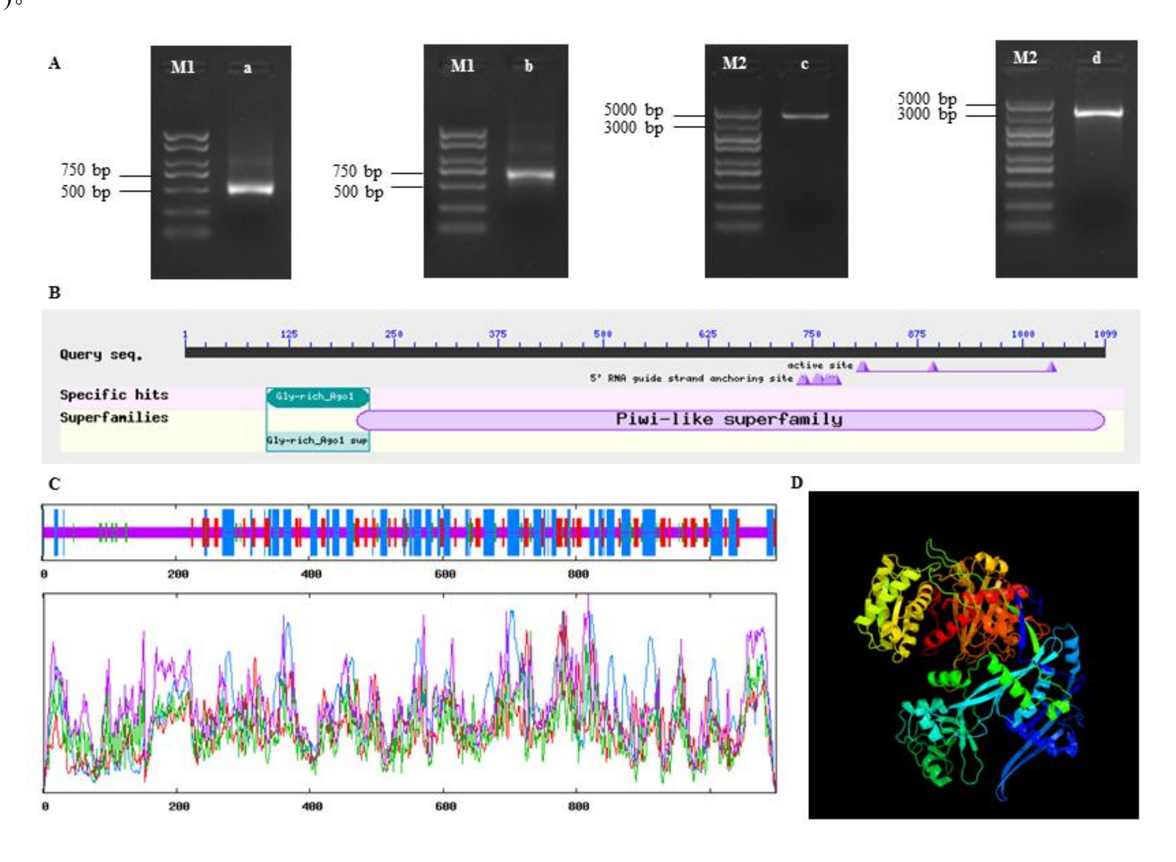
2.2 LtAGO1 蛋白二级、三级结构和功能预测

如图 2：C 所示，该蛋白由延伸链（Extended strand）、α螺旋（h）、β转角（t）和无规则卷曲（c）组成，其中无规则卷曲最多，占 52.14%；此外，占氨基酸序列较多的是α螺旋（28.57%）和延伸链（13.83%），β转角最少（5.46%）。为更深入了解蛋白结构，对 LtAGO1 预测并模拟蛋白三级结构（图 2：D），结果表明 LtAGO1 蛋白结构与 AGO2 蛋白最为相似，且可置信度达 100%。利用 Signal P 5.0 Server 预测得到 D 值（信号肽均值与 Y-max 的平均值）较小（0.0016），因此推测该基因编码的蛋白不含信号肽，为非分泌蛋白。对 LtAGO1 蛋白亚细胞定位的预测结果显示，LtAGO1 蛋白位于微体、细胞核、细胞质和细胞膜的分值分别为 0.3、0.3、0.1 和 0，说明该蛋白可能定位于细胞核和微体中。

2.3 LtAGO1 蛋白同源性比对及进化树分析

将 *LtAGO1* 编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的序列比对，发现与沉水樟（*Cinnamomum micranthum*）、海枣（*Phoenix dactylifera*）和小果野蕉（*Musa acuminata*）等的 AGO1 蛋白同源，且相似性较高（72.97%~76.33%）。经多序列比对发现 LtAGO1 蛋白与其他物种 AGO1 同源蛋白总体表现为 C 端较保守，N 端保守性较差，且同源序列中均存在一个保守的 piwi 结构域（图 3）。LtAGO1 蛋白与不同种类植物 AGO1 蛋白序列一致性较高，说明该基因在植物进化过程中比较保守。通过与其他物种 AGO1 同源蛋白比对及构建的进化树发现，北美鹅掌楸与樟科的沉水樟 AGO1 蛋白(RWR84608.1)聚在一起，亲缘关系最近，与海枣(XP_008812792.1) 、小果野蕉（XP_009386429.1）的亲缘关系较近，与麻风树(XP_012079244.1)和橡胶树(XP_021670505.1)的亲缘关系相对较

远(图 4)。



A **a.** 5′ -RACE；**b.** 3′ -RACE；**c.**中间片段；**d.**开放阅读框；**M1.** Maker 2000；**M2.** Maker 5000；**B.** 保守结构域；**C.** 二级结构；**D.** 三级结构。

A **a.** 5' -RACE segment；**b.** 3' -RACE segment；**c.** Middle segment；**d.** Open reading frame(ORF) fragment；**M1.** Maker 2000；**M2 .** Maker 5000；**B.** Conserved domain；**C.** Secondary structure；**D.** Tertiary structure.

图 2 LtAGO1 的克隆与结构分析

Fig. 2 The gel electrophoresis and structure analysis of AGO1 proteins

PIWI

图 3 LtAGO1 蛋白同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of LtAGO1 protein

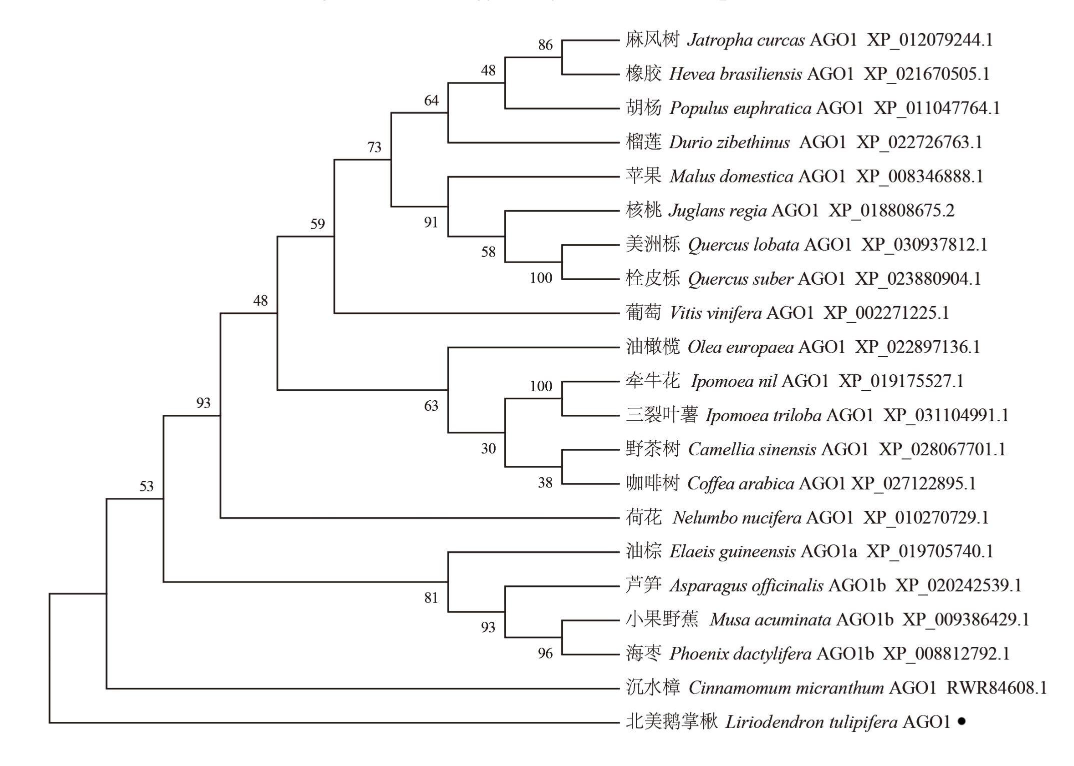


图 4　LtAGO1 蛋白系统进化分析

Fig. 4　Homology and phylogenetic analysis of LtAGO1 protein

2.4 *LtAGO1* 的时空表达差异分析

利用 qRT –PCR 检测分析 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸八个组织中的表达量，结果如图 5：A 所示。*LtAGO1* 在北美鹅掌楸所有的组织中均有表达，但表达量存在一定的差异。其中雄蕊和花芽的相对表达量较高，显著高于其他组织，其次是花瓣，在花萼、花芽、叶片、叶芽和雌蕊中的表达量较低，*LtAGO1* 在北美鹅掌楸不同组织间的相对表达量为雄蕊>花芽>花瓣>花萼>叶片>雌蕊>叶芽>茎。该基因在花器官中特异表达，由此推测 *LtAGO1* 可能在花器官发育过程中发挥着重要作用。

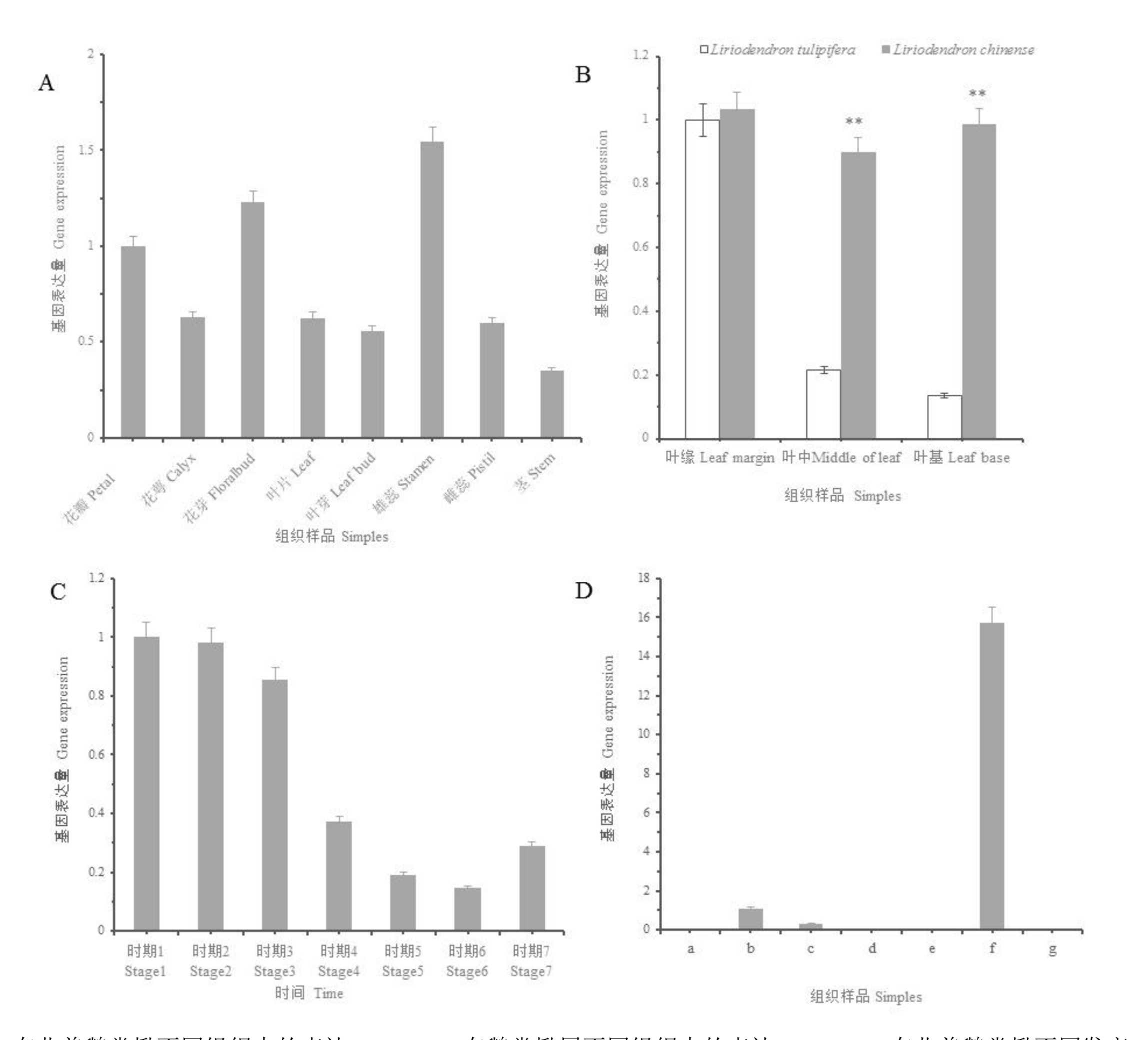
为了解该基因在叶器官不同位置的种间表达差异，对叶基部、叶中部和叶缘进行 qRT –PCR 检测，结果如图 5：B 所示。在北美鹅掌楸中，*AGO1* 的相对表达量为叶缘>叶中部>叶基部；在鹅掌楸中，*AGO1* 的相对表达量为叶缘>叶基部>叶中部。由此可知，*AGO1* 主要在鹅掌楸和北美鹅掌楸叶片中的叶缘部位表达，且该基因在鹅掌楸叶片所有部位的相对表达量均高于北美鹅掌楸的相对表达量，尤其是鹅掌楸叶中部和叶基部的表达量几乎是北美鹅掌楸的 4.5～7.5 倍，这说明 *AGO1* 在两个种间叶片的空间分布上存在差异。

为了解该基因在叶发育过程中的表达差异，对叶芽萌动期（stage1 和 stage2）、幼叶期（stage3）、成熟期（stage4～stage6）和衰老期（stage7）的叶片进行 qRT -PCR 检测，结果如图 5：C 所示，在叶芽萌动期至展叶期，*LtAGO1* 的表达量随着叶芽的逐渐膨大而降低；在生长期，*LtAGO1* 的表达量与叶片大小呈负相关的关系，且在叶面积最大时达到最低值；当叶片进入衰老期，*LtAGO1* 的表达量比生长后期的表达量高，而较展叶期低，且在叶原基形成的过程中，*LtAGO1* 的表达量远高于叶成熟期的表达量。*LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片不同发育阶段的相对表达量为叶芽萌动期>幼叶期>衰老期>成熟期，说明 *LtAGO1* 在北美鹅掌楸分生组织生长较旺盛的时期表达。

为进一步明确该基因在北美鹅掌楸叶缘缺刻发生时的表达部位，对叶缘凸出部分（即叶尖，a, c 和 e）和凹陷部分（b 和 d）进行 qRT–PCR 检测，结果如图 5：D 所示。*LtAGO1* 在叶柄的相对表达量远高于其他部位的表达量，相较而言，该基因在凹陷部位（b）的相对表达量高于凸出部位(c)，此外在其他部位基本不表达。因此，*LtAGO1* 在北美鹅掌楸叶片中的相对表达量为叶柄>叶凹陷>叶尖，说明 *LtAGO1* 可能在叶缘裂刻的形成中起着重要作用。

2.5 *LtAGO1* 启动子克隆、表达载体的构建及鉴定

以北美鹅掌楸基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，将扩增产物进行测序，得到 2 001 bp 的 *LtAGO1* 启动子序列（图 6：A）。将启动子扩增产物 *ProAGO1* 连接到植物表达载体 PBI121 上（图 6：D），连接产物经菌落 PCR 发现，大肠杆菌 PCR 扩增产物大小为 2 000 bp 左右，与阳性对照条带大小相一致（图 6：B），检测后的测序结果与数据库序列一致。经双酶切电泳后的结果显示（图 6：C），重组的质粒被酶切成两条条带，一条大小为 12 758 bp 的条带，另一条几乎与 *ProAGO1* 大小一致的序列条带，说明 *LtAGO1* 启动子成功构建到 PBI121 表达载体中。

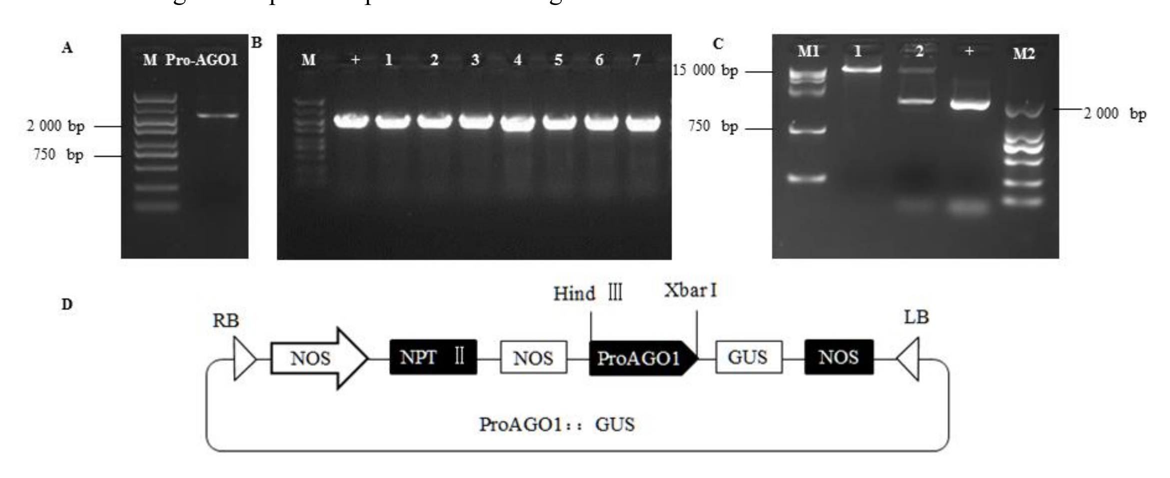


A. *AGO1* 在北美鹅掌楸不同组织中的表达；**B.** *AGO1* 在鹅掌楸属不同组织中的表达；**C.** *AGO1* 在北美鹅掌楸不同发育时期叶中的表达；**D.** *AGO1* 在北美鹅掌楸叶不同部位中的表达；**表示差异极显著（*P*<0.01）。

A. *AGO1* gene expression of different tissues in *L.tulipifera*；**B.** *AGO1* gene expression of different tissues in *Liriodendron* L；**C.** *AGO1* gene expression of different times of leaf in *L.tulipifera*；**D.** *AGO1* gene expression of different parts of leaf in *L.tulipifera*；**means extremely significant differences（*P*<0.01）.

图 5　*AGO1* 基因在鹅掌楸属不同组织中的表达模式

Fig. 5　Expression pattern of *AGO1* gene in different tissues of *Liriodendron* L.



A. M. DNA marker D5 000；Pro-AGO1. LtAGO1 启动子序列；**B.** 菌液 PCR 检测；**C.** M1. DNA marker D15 000；1. *Hin*d Ⅲ 单酶切；2. *Hin*d Ⅲ和 *Xbar* Ⅰ 双酶切；+. Pro-AGO1 启动子序列；**D.** PBI121-ProAGO1-GUS 表达载体的构建。

A. M. DNA marker D5 000；Pro-AGO1. LtAGO1 promoter sequence；**B.** PCR detection of Escherichia coli；**C.** M1. DNA marker D15 000；1. Single-digestion products by *Hin*d Ⅲ；2. Double-digestion products by *Hin*d Ⅲ and *Xbar* Ⅰ；+. LtAGO1 promoter sequence；**D.** PBI121-ProAGO1-GUS vector construction .

图 6 *LtAGO1* 启动子的克隆及载体构建

Fig. 6 Clone and vector construction of *LtAGO1* promoter

2.6 *LtAGO1* 启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 软件对 *LtAGO1* 启动子序列进行分析，结果如表 2 所示。*LtAGO1* 启动子中含有 RNA 聚合酶Ⅱ起始转录所必需的 CAAT-box 和 TATA-box 元件，还含有较多的光响应元件，如 Box 4 、G-box、GT1-motif 和 MYB 等，及与防御相关的响应元件，诸如防御与应激元件 TC-rich repeats，茉莉酸甲酯响应调节元件 CGTCA-motif、TGACG-motif，水杨酸响应元件 TCA-element，ABA 响应元件 MYC，冷胁迫相关元件 as-1，厌氧诱导调控元件 ARE，以及生长调控相关元件，如分生组织表达调控元件 CCGTCC-box、玉米醇溶蛋白代谢调控元件 O_2-site。

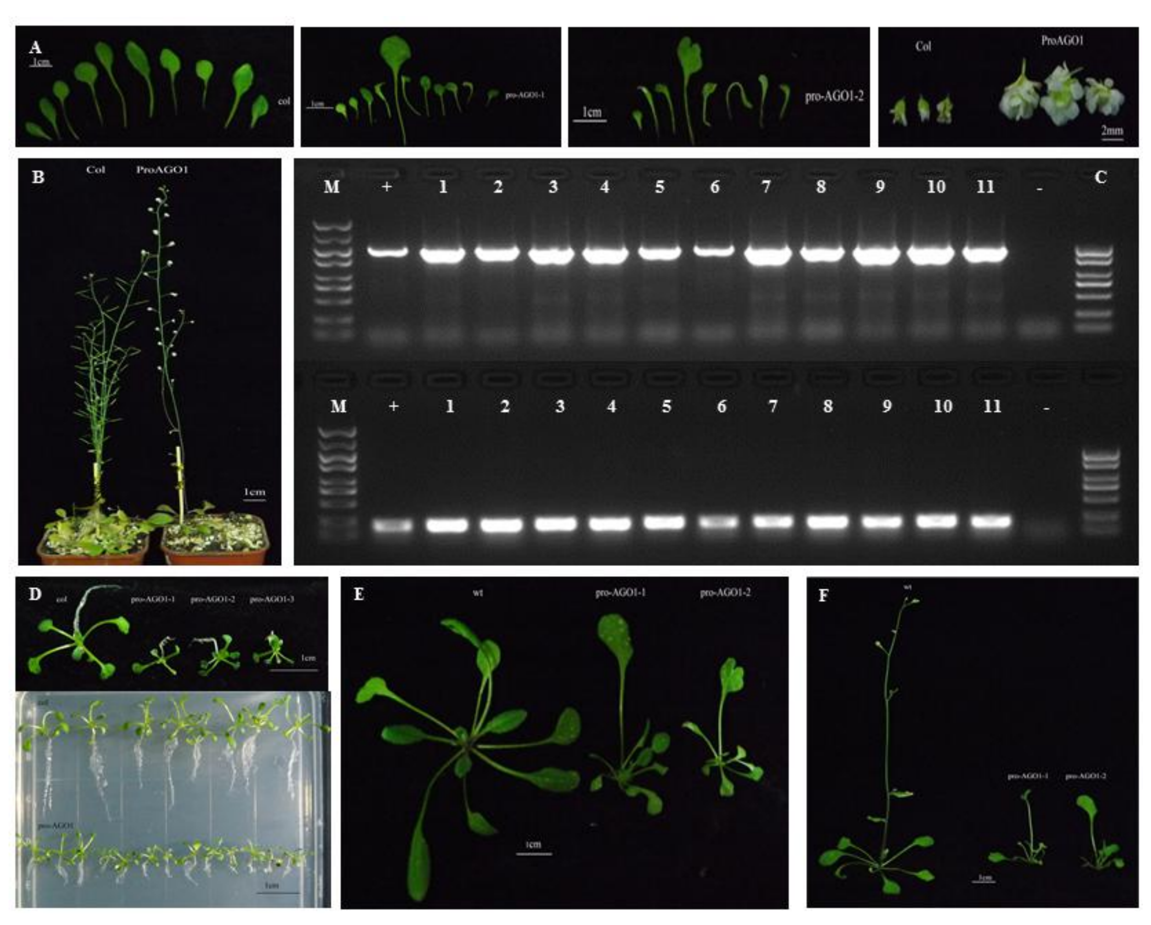
表 2 *LtAGO1* 启动子中的顺式作用元件预测

Tab 2. The cis-acting elements in promoter sequence of *LtAGO1*

顺式作用元件 Cis-acting element	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
A-box	CCGTCC	5	顺式调控元件 Cis-acting regulatory element
ABRE	GCAACGTGTC	8	ABA 响应元件 ABA-responsive element
ARE	AAACCA	5	厌氧诱导调控元件 Regulatory element for anaerobic induction
AT-rich	ATAGAAATCAA	1	富含 AT 的结合位点 AT-rich binding sites
Box 4	ATTAAT	2	光响应元件 Light responsive element
Box Ⅱ	TCCGTGTACCA	1	顺式调控元件 Cis-acting regulatory element
CAAT-box	CAAT/CAAAT	22	启动子和增强子区常见顺式作用元件 cis-actiing elements in promoter and enhancer regions
CCGTCC-box	CCGTCC	5	分生组织表达调控元件 Regulatory element related to meristem expression
CGTCA-motif	CGTCA	6	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA responsive regulatory element
G-box	CACGTT	12	光响应元件 Light responsive element
GT1-motif	GGTTAAT	1	光响应元件 Light responsive element
MYB	AACCTAA	1	光响应的 MYB 结合位点 MYB binding sites involved in photoreaction
MYC	CATGTG	1	ABA 响应元件 ABA-responsive element
O_2-site	GATGACATGG	1	玉米醇溶蛋白代谢调控 Cis-acting regulatory factors involved in regulation of zeinmetabolism
TATA-box	TATA	25	转录启始元件 Transcription initiation element
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	1	防御与应激相关元件 Element involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	CATGCATG	1	水杨酸响应元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TGACG-motif	TGACG	6	茉莉酸甲酯响应调节元件 MeJA responsive regulatory element
as-1	TGACG	6	冷胁迫相关元件 Element involved in chilling stress

2.7 转基因植株的检测及表型观察

经 PCR 检测后，共获得 *ProAGO1*::GUS 转基因阳性植株 11 株（图 7：C）。收种并播下 T2 代转基因植株，发现野生型的根长为（1.5±0.2）cm，转基因的根长为（0.5±0.2）cm，且须根和主根一样发达(图 7：D)，叶面积较野生型小，第二对真叶的顶端出现了凹形缺刻和白化。在 30d 时，鉴别出两种表型的株系，其主要特征如下：植株矮小（图 7：F），抽薹较晚，且出现了不育的重瓣花，大部分莲座叶表面积较野生型小（图 7：E）。其中株系 1 有一片向中侧轴方向延伸生长的叶片，叶基部狭窄，叶形呈扇形，其它叶片表面积是野生型的一半，且呈叶基歪斜、叶柄弯曲、中侧轴向和基顶轴向的不对称发育。株系 2 的莲座叶数量较野生型少两片，叶形缺刻程度较株系 1 更深，其中有 1 片叶的叶面积是其它叶片的 5~10 倍，叶基楔形，叶顶端凹陷呈心形，其他叶基歪斜，叶的主要生长方向由基部至顶端方向延伸生长，叶形态呈线形或条状发育，叶柄较短。由此可以推测 *LtAGO1* 启动子从叶原基分化期就开始影响拟南芥的叶片在中侧轴及基顶轴两个方向上发生程度各异的极性分化，且随着时间而加深变异的程度，最终使叶缘缺刻的表型得以维持。



A. 拟南芥叶片和花的表型；**B.** 拟南芥花不育的表型；**C.** M. DL5 000 DNA 分子标准量；+. *LtAGO1* 启动子序列；1～11. 转 *proAGO1*::GUS 拟南芥植株；- . 阴性对照；**D.** 拟南芥幼苗根的发育；**E.** 拟南芥莲座叶的发育；**F.** 拟南芥花的发育。

A. Leaf and flower phenotypes of *Arabidopsis thaliana* ； **B.** Phenotype of floral sterility in *Arabidopsis thaliana*；**C.** M. DNA marker DL5 000；+. *LtAGO1* promoter sequence；1～11. Transformed *proAGO1*::GUS in *Arabidopsis* plants； - . Negative control；**D.** Root development of *Arabidopsis* seedlings ； **E.** Development of rosette leaf in *Arabidopsis thaliana* ； **F.** Flower development in *Arabidopsis thaliana*.

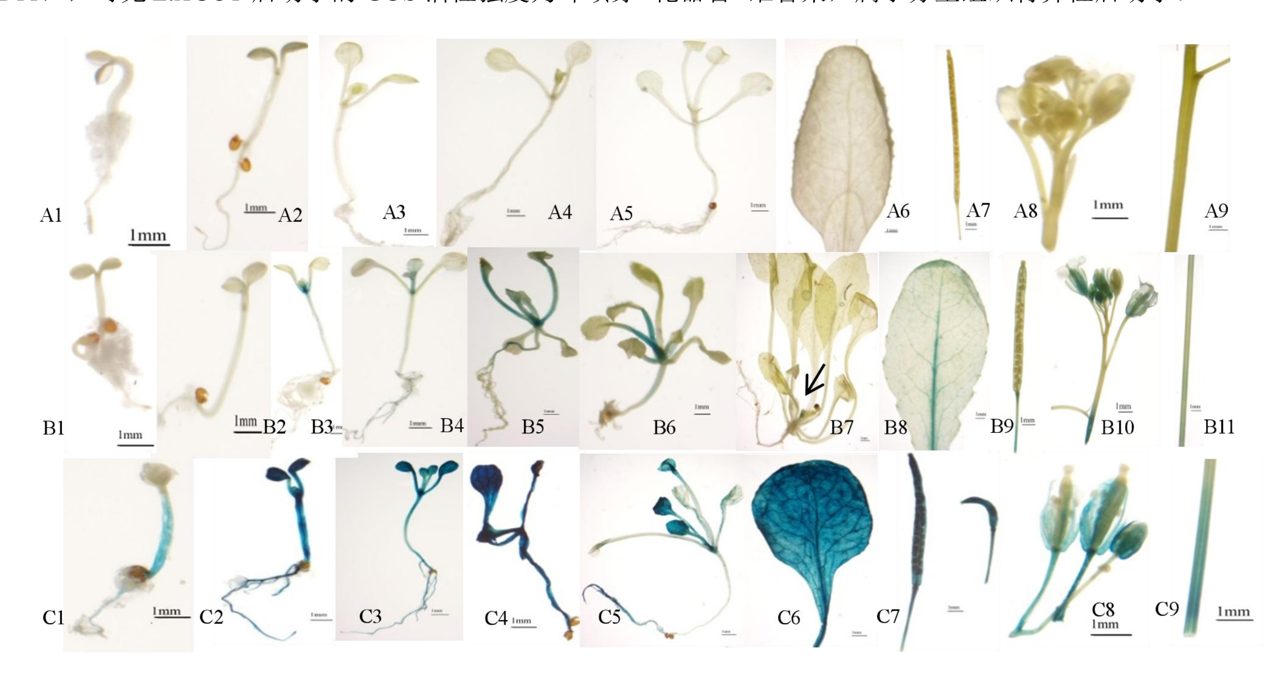
图 7 转 *proAGO1*::GUS 拟南芥植株的 PCR 鉴定和表型观察

Fig. 7 PCR identification and Phenotype of *proAGO1*::GUS transgenic *Arabidopsis*.

2.8 *LtAGO1* 启动子活性分析

如图 8 所示，由 *LtAGO1* 启动子控制的 GUS 基因在植株发育过程中呈阶段性表达。在萌发后的第 4d 和第 6d，幼苗的 GUS 活性不表达（图 8：B1-B2）；在叶芽分化期（第 9 天至 25 天），*LtAGO1* 启动子驱动 GUS 在

叶芽顶端稳定表达，且在新分化的叶柄上启动活性最强（图 8：B3-B7）。在生殖生长阶段，其在主叶脉、叶缘锯齿尖、果柄、花萼及雌蕊等部位表达，说明 *LtAGO1* 在成熟的花、果荚、叶和茎的维管束中均表达（图 8：B 8- B11），可见 *LtAGO1* 启动子的 GUS 活性强度为叶顶芽>花器官>维管束，属于分生组织特异性启动子。



A1-A9. 生长 4、6、9、12、16 和 45 d 的野生型植株；B1-B11. 生长 4、6、9、12、16、20、25 和 45 d 的转 *proAGO1*::GUS 植株；C1-C9. 生长 4、6、9、12、16 和 45 d 的转 *35S*::GUS 植株。

A1-A9. Wild Arabidopsis seedlings of 4, 6, 9, 12, 16 and 45-day-old；B1-B11. Transformed *proAGO1*::GUS *Arabidopsis* seedlings of 4, 6, 9, 12, 16, 20, 25 and 45-day-old；C1-C9. Transformed *35S*::GUS *Arabidopsis* seedlings of 4, 6, 9, 12, 16 and 45-day-old .

图 8 转基因拟南芥组织 GUS 染色

Fig. 8 Promoter-GUS assay of transgenic *Arabidopsis* in different parts

2.9 LtAGO1 蛋白共表达网络

LtAGO1 蛋白共表达网络显示(图 9)，*AGO1* 不仅与逆境应激响应基因 *DCLs*、*RDR6* 和 *SGS3* 发生互作， 还与介导 miRNA 叶极性分化的 *HEN1* 和 *HYL1* 基因发生互作。据报道长度 20~24 nt 的小 RNA(sRNA)能响应多种逆境胁迫(Chen et al.，2002；Zhang et al.，2008)，其 sRNA 的产生主要依赖 *DCL*、*AGO* 和 *RDR* 基因家族所编码的蛋白(Saito & Siomi , 2010)。*SGS3* 与 *RDR6* 协同作用能将单链 RNA 转录为 dsRNA，诱导产生转录后基因沉默（PTGS），降低病原菌的危害(Yoshikawa et al.，2013) 。此外，*RDR6* 还与 *AGO7*、*SGS3* 和 *DCL4* 共同调控 trans-acting siRNA 的通路，其下游靶基因是参与叶形远轴化的生长素响应因子(Peragine et al.，2004)。在烟草中 *NbDCL1* 的沉默导致植株矮小，叶片畸形。*HYL1* 通过介导 miRNA 来调节 *HD-ZIPⅢ* 基因的表达，从而维持叶的平展发育(Yu et al.，2005)。*HEN1* 最早被发现和花器官发育相关(Chen et al.，2002)，拟南芥中绝大部分 miRNA 均受到 *HEN1* 的调控(Yu et al.，2006)，和 *DCL1-3* 一样，*HEN1* 调控发育的同时也参与到 ABA 信号通路的调控中(Park et al.，2002)。*AGO1* 与这些基因相互作用，协同发挥抗逆及发育的调控作用。

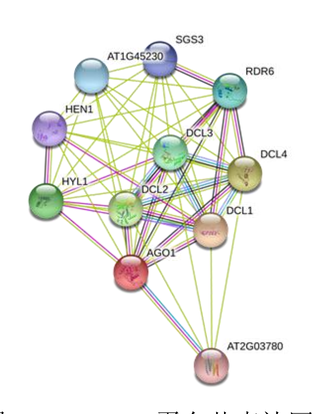


图 9　LtAGO1 蛋白共表达网络

Fig .9　Co-expression network of LtAGO1 protein

3 讨论与结论

本研究克隆得到北美鹅掌楸 *LtAGO1* 基因，通过生物信息学分析发现 *LtAGO1* 和其它物种 *AGO1* 的相似性很高，亚细胞定位于细胞核，这些信息与李红英等（2018）在胡杨中的研究结果相吻合。组织特异性分析发现，*LtAGO1* 在叶原基分化期的表达量明显高于成熟期和衰老期，且在幼叶的叶缘部位高含量表达，而在成熟叶中只在叶柄表达；*ZmAGO1a* 在玉米的幼叶及吐丝期的雌穗中表达量最高(徐东东，2014)，且在玉米新生叶中的表达量高于老叶（许鑫等，2014）。在北美鹅掌楸生殖生长的过程中，*LtAGO1* 在雄蕊的表达量最高，其次是花芽，与龙眼（杨曼曼，2015）、苹果（鹿游等，2013）的组织特异性研究结果类似，这些结果均说明 *AGO1* 在幼苗期参与叶原基的分化，而在生殖期普遍存在于细胞分裂生长较旺盛的花器官中。

启动子是基因转录的调控中心，本研究预测到 *LtAGO1* 基因启动子上含有多个光响应、激素诱导、分生组织表达及多个非生物胁迫响应元件，进一步研究发现 *ProAGO1* 能成功启动 GUS 表达，其表达具有时空特异性：GUS 在幼苗期的顶端分生组织表达，随着顶端逐渐分化出新的叶片，该启动子仅在新分化的叶柄处表达，后期也在成熟的花、果荚、叶和茎的维管束中表达。Vaucheret et al. (2006)对转 *ProAGO1*::GUS 的拟南芥分析发现，*AGO1* 在整个发育过程中表达，尤以在分生组织和维管束组织中的表达丰度最高。这说明 *AGO1* 的表达模式不仅局限于顶端分生组织，还在侧生分生组织中的其他部位表达，但目前有关相应的表达机理还未见报道。

叶极性分化是原基细胞感受极性分化信号并作出相应反应的过程，而沿着近远轴、基顶轴和中侧轴 3 个极性方向分化的过程决定了叶形态的建成过程(Du et al.，2018)。本研究通过转 *ProAGO1*::GUS 表达载体得到了叶柄弯曲、叶中侧轴向和基顶轴向极性丧失的拟南芥株系。在番茄中下调 *SlAGO1* 的表达，会导致远轴面出现与近轴面相同的毛状体，且叶片小叶柄也出现发育缺陷 (Wang et al.，2015)。此外，*LtAGO1* 启动子的表达也能促使拟南芥在发育过程中发生异位分生组织的活动，致使拟南芥叶基楔形、叶顶端缺刻呈心形。在对 *AGO1* 功能缺失突变体的其他研究中，发现 *AGO1* 的缺失也会促使植物体的叶卷曲、植株矮化及结实率下降(Wu et al., 2009；Liu & Nonomura, 2016)，Kidner et al. (2005)对过表达 *AGO1* 和双突变的拟南芥分析后发现，*AGO1* 是通过 *STM* 基因调节干细胞功能从而影响叶的极性效应。由此可知，*AGO1* 基因的缺失和过表达都会不同程度地影响叶极性的丧失，因此推测 *AGO1* 可能是通过两种不同的调控途径参与到叶的形态建成中。目前对这一分子机制的研究，普遍认为叶原基和叶发育的过程皆需要 *STM* 处于激活状态，且 *KNOX I* 家族其他基因处于沉默状态。*AGO1* 被发现是通过正向调控 *STM* 和抑制 *KNOX I* 的表达而决定叶片和花瓣近远轴的发生（Yang et al.，2006）。有研究认为，叶片的形态建成（如叶中孔洞的形成、叶缘的裂痕）均与关键部位的细胞发生程序性死亡（PCD）相关（Arunika et al.，2004），而正向卷曲叶片的发生是因为背面叶肉细胞的程序性死亡（PCD）（Zhang et al.，2009），那么 *AGO1* 是否也是通过调控细胞的分化方向和速度而影响叶形的多样性，且该基因如何响应叶原基分化的起始信号，其具体调控机制有待进一步研究。在生殖发育方面，该研究的表达株系抽薹较晚，花大而重瓣，且不育，这一现象与 Li et al.（2019）的研究结果相吻合。究其原因，可能是花器官由顶端分生组织分化形成，*AGO1* 在顶端分生组织中持续而稳定的表达，从而能参与到叶与花器官的形态建成中。但两者之间有无相关的基因共同被 *AGO1* 所调控，还有待于研究。

本研究以北美鹅掌楸为研究对象，首次分析了 *LtAGO1* 在不同组织部位的时空表达谱，明确了其启动子在拟南芥分生组织中的表达模式，初步探索了 *LtAGO1* 对北美鹅掌楸叶形发育的调控作用。下一步我们将会构造 *LtAGO1* 超表达载体转化杨树，并将 *LtAGO1* 与叶形发育的关键成员 *KNOX I* 家族基因进行蛋白互作研究。这些研究结果将为进一步分析 *AGO1* 基因在木本植物生长发育过程中的作用提供理论参考，也为促进观叶树种的叶形态遗传改良研究提供良好的实践意义。

参考文献 ：

ADRIEN T, PATRICIA B, MARIE CC, et al.， 2019. Cell cycle–dependent regulation and function of *ARGONAUTE1* in Plants[J]. Plant Cell, 31(8): 1734-1750.

ARUNIKA HL, GUNAWARDENA AN, JONE S, et al.， 2004. Programmed cell death pemodels lace plant leaf shape during development[J]. Plant Cell, 16(1): 60-73.

BOWMAN JL, ESHED Y, 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem[J]. Trends Plant Sci, 5(3): 110-115.

CHEN J, HAO Z, GUANG X, et al.， 2019. *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation[J]. Nat Plants, 5(1): 18-25.

CHEN X, LIU J, CHENG Y, et al.， 2002. *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower[J]. Development, 129(5): 1085-1094.

CLOUGH SJ, BENT AF, 1998. Floraldip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 16(6): 735-743.

DAI SY, HSU WH, YANG CH, 2019. The gene *ANTHER DEHISCENCE REPRESSOR(ADR)* controls male fertility by suppressing the ROS accumulation and anther cell wall thickening in *Arabidopsis*[J]. Sci Rep, 9(5112): 4635-4648.

DEY N, SARKAR S, ACHARYA S, et al.， 2015. Synthetic promoters in planta[J]. Planta, 242(5): 1077-1094.

DU F, GUAN C, JIAO Y, 2018. Molecular mechanisms of leaf morphogenesis[J]. Mol Plant, 11(9): 1117-1134.

ELENA L, FEDERICO B, MARIA JL, et al.，2020. *ARGONAUTE1* and *ARGONAUTE4* regulate gene expression and hypoxia tolerance[J]. Plant Physiol, 182(1): 287-300.

Feng N, 2018. Transcriptome and miRNA analyses of young inflorescences in wheat(*Triticum aestivum* L.)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 57-63. [冯楠， 2018. 小麦幼穗发育的转录组和 miRNA 调控网络分析[D].北京：中国农业科学院：57-63.]

JEFFERSON RA, 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. Plant Mol Biol Rep, 5(4): 387-405.

KIDNER CA, MARTIENSSEN RA, 2005. The role of *ARGONAUTE1*(*AGO1*) in meristem formation and identity[J]. Dev Biol, 280(2): 504-517.

LI HY, YANG X, WANG SB, 2018. Cloning and subcellular localization of *ARGONAUTE1* gene from *Populus euphratica*[J]. J Henan Univ Sci Technol, 39(5): 68-73. [李红英，杨雪，王少博，2018. 胡杨 *ARGONAUTE1* 基因克隆与亚细胞定位[J]. 河南科技大学学报，39(5)：68-73.]

LI SF, ZAO Y, JI LS, 2014. Influences of *AGO1* to the development of the *Arabidopsis* leaves with the serration margin[J]. J Hebei For Univ, 35(1): 51-57. [李素芬，赵燕，冀芦沙，2014. *AGO1* 基因对影响拟南芥叶边缘锯齿状发育的影响[J]. 河北科技大学学报，35(1)：51-57.]

LI SY, 2015. Gibberellin impact on lotus plant height and cloning and expression analysis of its related genes[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 25-34. [李四游，2015. 赤霉素对莲株型影响及其相关基因克隆与时空表达分析[D]. 武汉：华中农业大学：25-34.]

LI YH, YANG YQ, LIU Y, et al.， 2019. Overexpression of *OsAGO1b* induces adaxially rolled leaves by affecting leaf abaxial sclerenchy matous cell development in Rice[J]. Rice , 12(1): 60.

LIU C, XIN Y, XU L, et al., 2018. *Arabidopsis ARGONAUTE 1* binds chromatin to promote gene transcription in response to hormones and stresses[J]. Dev Cell, 44(3): 348-361.
LIU H, NONOMURA KI, 2016. A wide reprogramming of histone H3 modifications during male meiosis I in rice is dependent on the Argonaute protein MEL1[J]. J Cell Sci, 129(19): 3553-3561.
LIU X, TAN CC, CHENG X, et al., 2020. *miR168* targets *Argonaute1A* mediated miRNAs regulation pathways in response to potassium deficiency stress in tomato[J]. BMC Plant Biol, 20(1): 477.
LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 25(4): 402-408.
LU Y , MA C , MENG D , et al., 2013. Clone and expression of *AGO1* gene and development-related miRNA in apple(Golden Delicious)[J]. J Chin Agric Univ, 18 (5): 69–76. [鹿 游，马 超，孟 冬，等，2013. 苹果‘金冠’ *AGO1* 基因克隆及与发育相关 miRNA 表达分析[J]. 中国农业大学学报，18 (5)：69–76 .]
MA JK, MEI GG, LIU HH, et al., 2019. Overexpression of a Novel *LcKNOX* transcription factor from *Liriodendron chinense* induces lobed leaves in *Arabidopsis thaliana*[J]. Forests , 11(1): 33.
MA JK, WEI LM, LI JY, et al., 2018. The analysis of genes and phytohormone metabolic pathways associated with leaf shape development in *Liriodendron chinense* via De Novo transcriptome sequencing[J]. Genes, 9(12): 577.
MA M, GUO KQ, GUO QR, 2007. Studies on genomic DNA extraction of forest species with improved CTAB method[J].Biotechnology, 17(3): 36-38. [马明，杨克强，郭起荣，2007. 改良 CTAB 法提取林木树种基因组 DNA 的研究[J]. 生物技术，17(3) ：36-38.]
PARK W, LI J, SONG R, et al., 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and *HEN1*, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. Curr Biol, 12(17): 1484-1495.
PERAGINE A, YOSHIKAWA M, WU G, et al., 2004. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*[J]. Genes Dev, 18(19): 2368-2379.
SAITO K, SIOMI MC, 2010. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals[J]. Dev Cell, 19(5): 687-697.
SHEN ZG, YU D, HU ZH, et al., 2003. Comparative and the correlative studies on the structure and the content of anthraquinones in 3 *Aloe* leaves[J]. Acta Bot Boreal-Occidental Sin, 2003, 23(7)：1148-1153. [沈宗根，郁达，胡正海，等，2003. 芦荟属 3 种植物不同叶龄、不同部位业内蒽醌类物质含量及其变化的研究[J]. 西北植物学报，2003，23(7)：1148-1153.]
SHIH CF, HSU WH, PENG YJ, et al., 2014. The *NAC-like* gene *AIF* acts as a repressor that controls anther dehiscence by regulating genes in the jasmonate biosynthesis pathway in *Arabidopsis*[J]. J Exp Bot, 65(2): 621-639.
TU ZH, HAO ZY, ZHONG WP, et al., 2019. Identification of suitable reference genes for RT-qPCR assays in *Liriodendron chinense* (Hemsl.) sarg[J]. Forests ,10(5): 441-457.
VAUCHERET H, 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations[J]. Genes Dev, 20(7): 759-771.
WANG T, LI R, WEN L, et al., 2015. Functional analysis and RNA sequencing indicate the regulatory role of Argonaute1 in tomato compound leaf development[J]. PLoS ONE, 10(10): e140756.
WANG YY, 2019. New function of *AGO1* in *arabidopsis* small RNA pathway[D]. Shenzhen: Shenzhen University: 38-53. [王永益，2019. 拟南芥 *AGO1* 在小 RNA 通路中的新功能研究[D]. 深圳：深圳大学：38-53.]
WU L, ZHANG Q, ZHOU H, et al., 2009. Rice microRNA effector complexes and targets[J]. Plant Cell, 21(11): 3421-3435.
XIAO HJ, 2014. Cloning and functional analysis of leaf senescence ce-related genes in *Capsicum Annuum* L.[D].Yangling: Northwest A & F University: 43-76. [肖怀娟，2014. 辣椒叶片衰老相关基因的克隆与功能分析

[D]. 杨凌：西北农林科技大学：43-76.]
XU DD, 2014. Cloning and functional identification of maize *AGO1a* gene[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences: 27-39. [徐东东，2014. 玉米 *AGO1a* 基因分离与功能鉴定[D]. 北京：中国农业科学院：27-39.]
XU X, LI DD, LI SJ, et al.，2014. Clone and expression analysis of *AGO* genes from *Zea mays* L[J]. Northwest Bull Bot, 34(3): 449-453. [许鑫，李丹丹，李双江，等，2014. 玉米 *AGO* 基因的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报，34(3)：449-453.]
YANG L, HUANG W, WANG H, et al.，2006. Characterizations of a hypomorphic argonautel mutant reveal novel *AGO1* functions in *Arabidopsis* lateral organ development[J]. Plant Mol Biol, 61(1-2): 63-78.
YANG MM, 2015. The study of cloning and expression analysis of *AGO* gene from embryogenic callus in *Dimocarpus longan* Lour[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University: 56-64. [杨曼曼，2015. 龙眼胚性愈伤组织 *AGO* 基因克隆与表达分析[D]. 福州：福建农林大学：56-64.]
YANG Y, XU M, LUO Q, et al.，2014. De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by illumina sequencing[J]. Gene, 534(2): 155-162.
YAO XH, WANG Y, AN LK, et al.， 2021. Identification and expression analysis of *HvtAGO1* gene in response to barley leaf stipe in Tibetan Hulless Barley[J]. Acta Bot Boreal-Occidental Sin, 41(1): 20-28. [姚晓华，王越，安立昆，等，2021. 青稞 *HvtAGO1* 基因的克隆及其在条纹病胁迫下的表达[J]. 西北植物学报，41(1) ：20-28.]
YOSHIKAWA M, IKI T, TSUTSUI Y, et al.， 2013. 3’fragment of miR173-programmed RISC-cleaved RNA is protected from degradation in a complex with RISC and *SGS3*[J]. Pnas, 110 (10) : 4117-4122.
YU B J, CHEN X, EBRIGHT YW, et al.， 2006. *HEN1* recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposis a methyl group onto the 2’OH of the 3’terminal nucleotide[J]. Nucl Acid Res, 34(2): 667-675.
YU B, YANG Z, LI J, et al.， 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis[J]. Science, 307(5711): 932-935.
ZHANG G, XU Q, ZHU X, et al.，2009. *SHALLOT-LIKE1* is a *KANAD* I transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abxial cell development[J]. Plant Cell, 21(3): 719-735.
ZHANG JF, YUAN LJ, SHAO Y, et al.， 2008. The disturbance of small RNA pathways enhanced abscisic acid response and multiple stress responses in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Environ, 31(4): 562-574.